

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000070

International filing date: 12 January 2005 (12.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0400214
Filing date: 12 January 2004 (12.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 March 2005 (30.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



PCT/FR 2005 / 000070

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

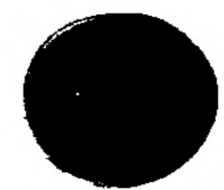
Fait à Paris, le **20 JAN. 2005**

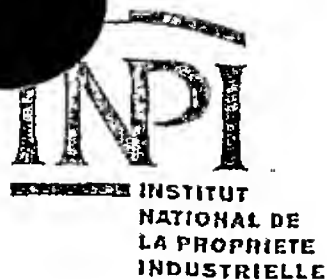
Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 210502

REMISE DES PIÈCES

Réservé à l'INPI

DATE **12 JAN 2004**
LIEU **69 INPI LYON**

N° D'ENREGISTREMENT **0400214**
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE **12 JAN. 2004**
PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier
(facultatif) **241101 D21874 FT**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU
129, rue Servient
69326 Lyon Cedex 03
FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale
ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

N°

Date

Transformation d'une demande de
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Microorganisme évolué pour la production de 1,2-propanediol

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐

S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒

Personne morale

☐

Personne physique

Nom
ou dénomination sociale

METABOLIC EXPLORER

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

423703107

Domicile
ou
siège

Rue

Code postal et ville

Pays

BIPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE
FRANCE

FRANCE

Française

N° de télécopie (facultatif)

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»
Remplir impérativement la 2^{ème} page

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

12 JAN 2004

LIEU

69 INPI LYON

N° D'ENREGISTREMENT

0400214

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

241101 FT

Cabinet REGIMBEAU

N° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Adresse

Rue

129, rue Servient

Code postal et ville

69326 Lyon Cedex 03

Pays

N° de téléphone (facultatif)

04 26 84 34 40

N° de télécopie (facultatif)

04 26 84 34 49

Adresse électronique (facultatif)

lyon@regimbeau.fr

7 INVENTEUR (S)

Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques

Les demandeurs et les inventeurs
sont les mêmes personnes

☐ Oui

☒ Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)

8 RAPPORT DE RECHERCHE

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Établissement immédiat
ou établissement différé

☒

☐

Paiement échelonné de la redevance
(en deux versements)

Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt

☐ Oui

☐ Non

**9 RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES**

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)

☐ Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la
décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG

**10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES
ET/OU D'ACIDES AMINÉS**

☒ Cochez la case si la description contient une liste de séquences

Le support électronique de données est joint

☒

La déclaration de conformité de la liste de
séquences sur support papier avec le
support électronique de données est jointe

☒

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suites»,
indiquez le nombre de pages jointes

USC DE LA PREFECTURE
DE LYON

5 La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'un microorganisme évolué pour la production de 1,2-propanediol, le microorganisme évolué ainsi obtenu et son utilisation pour la préparation de 1,2-propanediol.

10 Le 1,2-propanediol ou propylène glycol, dialcool en C3, est un produit chimique utilisé dans de nombreux domaines. C'est un constituant des résines de polyester insaturés ; des détergents liquides ; des agents de refroidissement, anti-gel et de fluide de dégivrage des avions. L'utilisation du propylène glycol est en émergence depuis les années 1993-1994 en remplacement des dérivés éthyléniques qui sont reconnus comme plus toxiques que les dérivés propyléniques.

15 Le 1,2-propanediol est actuellement produit par voie chimique par un procédé d'hydratation d'oxyde de propylène utilisant de large quantité d'eau. La production d'oxyde de propylène peut être effectuée selon deux procédés l'un utilisant de l'épichlorydrine, l'autre de l'hydroperoxide. Ces deux voies utilisent des produits fortement toxiques. De plus, la voie de l'hydroperoxide génère des co-
20 produits tels que le ter-butanol ou le 1 phenyl éthanol qu'il est nécessaire de valoriser pour rentabiliser la production d'oxyde de propylène. La voie chimique produit généralement du 1,2-propanediol racémique alors qu'il existe deux formes de stéréoisomères le (R) 1.2 propaendiol et le (S) 1,2-propanediol dont l'intérêt n'est pas négligeable pour d'autres applications.

25 Ces inconvénients liés à la production chimique du 1,2-propanediol font de la voie de production biologique une alternative prometteuse. Plusieurs microorganismes sont capables de produire naturellement du (S) ou (R) 1,2-propanediol à partir de sucre, tels que le glucose ou le xylose qui sont métabolisés par la voie de la glycolyse, ou encore, à partir de déoxyhexoses qui conduisent
30 alors à la formation de (S) 1,2-propanediol (*Cameron D. C. et coll. (1998) Biotechnol. Prog.*). Parmi les microorganismes les plus performants sont à citer *Clostridium sphenoides* (*Tran Din K. et coll. 1986*) et *Thermoanaerobium thermosaccharolyticum* (*Altaras N. E. and Cameron D. C. 2001*). Ce dernier est

capable de fermenter plusieurs types de sucres en (R) 1,2-propanediol avec un rendement qui varie de 0.13 à 0.28 g de 1,2-propanediol produit/ g de glucose consommé. Chez ces deux microorganismes, les enzymes responsables de la synthèse de 1,2-propanediol n'ont pas été identifiées, et l'amélioration de leurs performances est limitée par le manque d'outils génétiques disponibles. Par ailleurs, *E. coli* possède tous les gènes nécessaires à la production de 1,2-propanediol même si *E. coli* ne produit pas naturellement du 1,2-propanediol. En effet, le 1,2-propanediol doit être produit à partir de méthyl glyoxal, un composé fortement toxique pour la cellule même à faible concentration. Aussi, des procédés utilisant des souches d'*E. coli* génétiquement modifiées afin qu'elles produisent du 1,2-propanediol ont été décrits notamment dans US 6 303 352, US 6 087 140 et WO 98/37204. Ces procédés utilisent notamment la surexpression d'une ou plusieurs enzymes impliquées dans la voie métabolique de production du 1,2-propanediol par clonage de leurs gènes dans des plasmides et donc imposent une pression de sélection à l'aide d'antibiotiques. Pour améliorer les performances des souches certains gènes endogènes sont également délétés (voir par exemple Altaras N. E. and Cameron D. C. (2000) *Biotechnol. Prog.* 16, 940-946 ; Altaras N. E. and Cameron D. (1999) *Appl. Env. Microb.*, 65, 1180-1185).

Un procédé utilisant un microorganisme évolué coproduisant du 1,2-propanediol et de l'acétone, deux coproduits valorisables, n'a jusqu'alors jamais été décrit.

La présente invention concerne donc un procédé de préparation d'une souche de microorganismes évolués pour la production de 1,2-propanediol par métabolisme d'une source de carbone simple, ledit procédé comprenant la culture sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple, d'une souche bactérienne initiale comprenant une délétion du gène *tpiA* et une délétion d'au moins un gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal (propanal) en lactate, afin de faire évoluer dans ladite souche initiale un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du DHAP en méthyl glyoxal puis en 1,2-propanediol vers des gènes évolués ayant une activité de 1,2-propanediol optimisée. L'amélioration des performances est obtenue par la sélection d'une souche ayant une activité de 1,2-propanediol optimisée.

isole la ou les souches de microorganismes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée.

Le gène *tpiA* code pour la triose phosphate isomérase qui catalyse la conversion du DHAP en glycéraldéhyde 3 phosphate. La délétion de ce gène a pour objet d'assurer la synthèse d'une quantité suffisante de méthyl glyoxal. Théoriquement, la délétion du gène *tpiA* doit permettre d'assurer que 50% du carbone du glucose métabolisé par les cellules soit affecté à la préparation du méthyl glyoxal à partir du dihydroxy acétonephosphate.

La délétion d'au moins un gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal (propanal) en lactate a pour objet d'inhiber la conversion du méthyl glyoxal en lactate, de manière que l'essentiel du méthyl glyoxal présent et produit par la souche initiale, comme par la souche évoluée obtenue, soit employé par la machinerie cellulaire desdites souches pour la préparation de 1,2-propanediol.

Les gènes impliqués dans la conversion du méthyl glyoxal en lactate sont choisis parmi le gène *gloA* codant pour la glyoxylase I (catalysant la synthèse de lactoyl glutathione à partir de méthylglyoxal) et les gènes *aldA* et *aldB* codant pour une lactaldéhyde déshydrogénase (catalysant la synthèse de (S) lactate à partir de (S) lactaldéhyde). De préférence, la souche initiale comprend la délétion des trois gènes *gloA*, *aldA* et *aldB*.

De manière avantageuse, on effectue une modification supplémentaire de la souche initiale qui consiste à supprimer les voies naturelles de fermentation du glucose qui sont consommatrices d'équivalents réducteurs sous forme de NADH afin d'éliminer ces voies métaboliques qui sont en compétition avec la production de 1,2-propanediol.

On citera en particulier la délétion du gène *ldhA* codant pour la lactate déshydrogénase catalysant la synthèse de lactate à partir de pyruvate, et celle du gène *adhE* codant pour l'alcool-aldéhyde déshydrogénase catalysant la synthèse d'éthanol à partir d'acétyl-CoA.

De même, on peut obliger le microorganisme à utiliser le complexe pyruvate déshydrogénase pour produire, en anaérobiose, de l'acétyl-CoA et du NADH à partir du pyruvate. Ceci peut être obtenu en déléant les gènes *pflA* et, *pflB* codant pour la pyruvate formate lyase.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la souche initiale comprend donc également une délétion d'au moins un gène choisi parmi *ldhA*, *pflA*, *pflB* et *adhE*, de préférence la délétion des quatre gènes *ldhA*, *pflA*, *pflB* et *adhE*.

- 5 De manière encore plus avantageuse, la souche initiale selon l'invention comprendra également au moins un gène codant pour une enzyme favorisant en anaérobiose, le métabolisme du pyruvate en acétate.

De préférence, l'enzyme favorise, en anaérobiose, le métabolisme du pyruvate vers la production d'acétyl-CoA et de NADH. Plus préférentiellement
10 cette enzyme est un complexe pyruvate déshydrogénase.

De manière avantageuse, ledit gène codant pour une enzyme favorisant, en anaérobiose, le métabolisme du pyruvate en acétate est peu sensible à l'inhibition par le NADH.

Ce gène peut être un gène endogène, codant pour une protéine endogène,
15 ou encore un gène exogène ou hétérologue, codant pour une enzyme endogène ou exogène.

Dans le cas d'un gène endogène codant pour une protéine endogène sensible à l'inhibition par le NADH, le procédé d'évolution selon l'invention permettra de sélectionner les souches à activité « 1,2-propanediol synthase »
20 améliorée dont ledit gène codant pour une enzyme favorisant, en anaérobiose, le métabolisme du pyruvate en acétate code pour une enzyme évoluée rendue peu sensible à l'inhibition par le NADH.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on peut introduire dans la souche initiale un gène hétérologue qui code pour une enzyme peu sensible à
25 l'inhibition par le NADH, ou codant pour une enzyme sensible, mais rendue peu sensible par la mise en œuvre du procédé d'évolution selon l'invention.

De manière avantageuse, on introduit dans la souche évoluée préalablement isolée, obtenue par le procédé d'évolution selon l'invention, un ou plusieurs gènes hétérologues codant pour une ou plusieurs enzymes impliquées
30 dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone, pour obtenir une souche évoluée modifiée.

Le présent document permet de produire et de vendre des souches microbiennes. Le présent document est destiné à être utilisé comme document de référence.

d'améliorer les performances de production en 1,2-propanediol. En effet, l'acétate est un composé inhibiteur de la croissance bactérienne à faible concentration (15 g/l) et bloque rapidement l'évolution des performances de la souche cultivée en chemostat en conditions anaérobies.

5 L'introduction dans la souche évoluée des gènes codant pour les enzymes catalysant la transformation de l'acétate en acétone entraîne une diminution de la concentration résiduelle en acétate lors de la culture en chemostat. De l'acétone est produit, composé largement moins inhibiteur de la croissance que l'acétate, la croissance de la souche et la production de 1,2-propanediol sont favorisées.

10 De manière avantageuse, le ou les gènes hétérologues codant pour une ou plusieurs enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate proviennent de *C. acetobutylicum*.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, on cultive la souche évoluée modifiée obtenue précédemment sous pression de sélection dans
15 un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple afin de faire évoluer dans ladite souche évoluée modifiée un ou plusieurs gènes impliqués dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone vers une activité « acétone synthase » améliorée, puis on sélectionne et on isole les souches de microorganismes évolués de deuxième génération ayant une activité « 1,2-
20 propanediol synthase » améliorée et une activité « acétone synthase » améliorée.

La présente invention concerne aussi une souche initiale selon l'invention telle que définie ci-dessus, ci-après et dans les exemples.

Elle concerne également une souche évoluée ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée susceptible d'être obtenue par le procédé selon
25 l'invention, telle que définie ci-dessus, ci-après et dans les exemples, cette définition englobant les souches évoluées de deuxième génération qui ont au surplus une activité « acétone synthase » améliorée.

L'invention concerne enfin un procédé de préparation de 1,2-propanediol dans lequel on cultive une souche évoluée selon l'invention dans un milieu de
30 culture approprié comprenant une source simple de carbone, puis on récupère le 1,2-propanediol produit et le cas échéant de l'acétone, qui sont éventuellement purifiés.

Les souches de microorganismes modifiés, initiaux et évolués, selon l'invention peuvent être procaryotiques ou eucaryotiques, susceptibles d'être transformés et cultivés pour permettre la production de 1,2-propanediol et le cas échéant d'acétone.

L'homme du métier sera à même de sélectionner lesdits microorganismes au regard de ses connaissances générales dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire, et, le cas échéant, d'identifier les gènes de ces microorganismes correspondant aux gènes de *E. coli* mentionnés précédemment.

Par souche de microorganismes, on entend selon l'invention un ensemble de microorganismes d'une même espèce comprenant au moins un microorganisme de ladite espèce. Ainsi, les caractéristiques décrites pour la souche s'appliquent à chacun des microorganismes de ladite souche. De même, les caractéristiques décrites pour l'un des microorganismes de la souche s'appliqueront à l'ensemble desdits microorganismes la composant.

Les microorganismes modifiés selon l'invention sont choisis parmi les bactéries, les levures et les champignons, et notamment ceux des espèces suivantes : *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Candida sp.*

Dans un mode de réalisation préféré, la souche bactérienne est une souche d'*Escherichia*, en particulier d'*E. coli*. Dans un autre mode de réalisation, la souche bactérienne est une souche de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.

Dans un autre mode de réalisation, la souche de levure est une souche de *Saccharomyces*, en particulier *S. cerevisiae*.

L'invention est décrite ci-dessus, ci-après et dans les exemples par rapport à *E. coli*. Ainsi, les gènes susceptibles d'être délétés ou surexprimés pour les souches évoluées selon l'invention sont définis principalement par l'emploi de la dénomination du gène de *E. coli*. Cependant, par emploi à une signification plus large, selon l'invention, on inclut les gènes correspondant à d'autres microorganismes. On entend également par microorganismes les gènes d'*E. coli*.

coli, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*.

Les moyens d'identification des séquences homologues et de leurs pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment les programmes BLAST qui peuvent être utilisés à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur ce site. Les séquences obtenues peuvent alors être exploitées (e.g. alignées) en utilisant par exemple les programmes CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), avec les paramètres indiqués par défaut sur ces sites.

En utilisant les références données sur GenBank pour les gènes qui sont connus, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres organismes, souches bactériennes, levures, champignons, mammifères, plantes, etc. Ce travail de routine est avantageusement effectué en utilisant les séquences consensus pouvant être déterminées en réalisant des alignements de séquences avec des gènes issus d'autres microorganismes, et en dessinant des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook et al. (1989 Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

Par « délétion », on entend selon l'invention une suppression de l'activité du gène « délété ». Cette suppression peut être une inactivation du produit d'expression du gène concerné par un moyen approprié, ou bien l'inhibition de l'expression du gène concerné, ou encore la délétion d'au moins une partie du gène concerné de manière soit que son expression n'ait pas lieu (par exemple délétion d'une partie ou de l'ensemble de la région promotrice nécessaire à son expression) soit que le produit d'expression ait perdu sa fonction (par exemple délétion dans la partie codante du gène concerné). De manière préférentielle, la délétion d'un gène comprend la suppression de l'essentiel dudit gène, et le cas échéant son remplacement par un gène marqueur de sélection permettant de

faciliter l'identification, l'isolement et la purification des souches évoluées selon l'invention.

L'inactivation d'un gène se fait préférentiellement par recombinaison homologue. (Datsenko, K.A.; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of
5 chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 : 6640-6645). Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : un fragment d'ADN linéaire est introduit dans la cellule, lequel fragment est obtenu in vitro, comprenant les deux régions flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de
10 résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. Les cellules ayant subi un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit sont sélectionnées par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé.
15 Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et négative, afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaisons.

La technique préférentiellement utilisée pour l'introduction de ces gènes dans la souche est l'électroporation, technique bien connue de l'homme du métier. Le protocole en est rappelé brièvement : les gènes hétérologues d'intérêt sont
20 clonés dans un vecteur d'expression entre un promoteur et un terminateur. Ce vecteur possède en outre un gène de résistance à un antibiotique afin de sélectionner les cellules le contenant et une origine de réplication fonctionnelle chez la souche hôte afin qu'il puisse se maintenir. Le protocole nécessite la préparation de cellules hôtes électrocompétentes qui sont ensuite transformées
25 par électroporation par le vecteur.

Selon l'invention, les gènes introduits par électroporation sont préférentiellement les gènes *adc*, *ctfA* et *B*, *thl* codant respectivement pour l'acétoacétate carboxylase, la coenzyme A transférase et la thiolase de la voie naturelle de production d'acétone de *Clostridium acetobutylicum*, microorganisme
30 reconnu comme extrêmement performant pour la production d'acétone par voie biologique.

Le procédé d'évolution selon l'invention est un procédé de préparation de microorganismes évolués permettant une modification des voies métaboliques, qui comprend de préférence les étapes suivantes :

- 5 a) Modification d'un microorganisme pour obtenir un microorganisme initial de manière à inhiber la production ou la consommation d'un métabolite autrement consommé ou produit lorsque les cellules du microorganisme initial est cultivé sur un milieu défini,
- 10 b) Culture des microorganismes initiaux modifiés précédemment obtenus sur ledit milieu défini pour le faire évoluer, le milieu défini pouvant également comprendre un co-substrat nécessaire à cette évolution,
- c) Sélection des cellules de microorganismes modifiés capables de se développer sur le milieu défini, éventuellement avec un co-substrat.

Un tel procédé d'évolution est décrit notamment dans la demande de brevet FR 03 13054, déposée le 6 novembre 2003, dont le contenu est incorporé ici par
15 référence.

En l'espèce, la voie métabolique évoluée est la voie de biosynthèse du 1,2-propanediol, et le cas échéant la voie de biosynthèse de l'acétone.

Par « milieu défini », on entend selon l'invention un milieu de composition moléculaire connue, adapté à la croissance du microorganisme. Le milieu défini
20 est substantiellement exempt de métabolite dont on supprime la production ou la consommation en réalisant la modification.

Par « co-substrat », on entend selon l'invention une molécule carbonée ou non, différent du substrat, qui est impliqué dans une réaction et donnant un ou plusieurs atomes au substrat afin de former le produit. Le co-substrat n'a pas de
25 propriété mutagène reconnue.

Par « sélection », on entend selon l'invention un procédé de culture, éventuellement en continu, conduit en appliquant des taux de dilution croissants de telle sorte de ne conserver dans le milieu de culture que les microorganismes ayant un taux de croissance égal ou supérieur au taux de dilution imposé. Ce
30 faisant, on conserve les microorganismes ayant évolués de telle sorte que la modification réalisée n'affecte plus la croissance.

Le procédé d'évolution selon l'invention est un procédé de préparation de microorganismes évolués permettant une modification des voies métaboliques, qui comprend de préférence les étapes suivantes :

- 5 a) Modification d'un microorganisme pour obtenir un microorganisme initial de manière à inhiber la production ou la consommation d'un métabolite autrement consommé ou produit lorsque les cellules du microorganisme initial est cultivé sur un milieu défini,
- 10 b) Culture des microorganismes initiaux modifiés précédemment obtenus sur ledit milieu défini pour le faire évoluer, le milieu défini pouvant également comprendre un co-substrat nécessaire à cette évolution,
- c) Sélection des cellules de microorganismes modifiés capables de se développer sur le milieu défini, éventuellement avec un co-substrat.

Un tel procédé d'évolution est décrit notamment dans la demande de brevet FR 03 13054, déposée le 6 novembre 2003.

- 15 En l'espèce, la voie métabolique évoluée est la voie de biosynthèse du 1,2-propanediol, et le cas échéant la voie de biosynthèse de l'acétone.

20 Par « milieu défini », on entend selon l'invention un milieu de composition moléculaire connue, adapté à la croissance du microorganisme. Le milieu défini est substantiellement exempt de métabolite dont on supprime la production ou la consommation en réalisant la modification.

Par « co-substrat », on entend selon l'invention une molécule carbonée ou non, différent du substrat, qui est impliqué dans une réaction et donnant un ou plusieurs atomes au substrat afin de former le produit. Le co-substrat n'a pas de propriété mutagène reconnue.

- 25 Par « sélection », on entend selon l'invention un procédé de culture, éventuellement en continu, conduit en appliquant des taux de dilution croissants de telle sorte de ne conserver dans le milieu de culture que les microorganismes ayant un taux de croissance égal ou supérieur au taux de dilution imposé. Ce faisant, on conserve les microorganismes ayant évolués de telle sorte que la
- 30 modification réalisée n'affecte plus la croissance.

Par « gène évolué », on entend selon l'invention une succession d'acide nucleique délimité par un codon start et un codon stop en phase et ayant, à l'issue de la sélection, au moins un acide nucléique différent par rapport à la séquence initiale.

5 Par « protéine évoluée », on entend selon l'invention une succession d'acides aminés (séquence protéique) ayant, à l'issue de la sélection, au moins un acide aminé différent par rapport à la séquence protéique initiale.

Les gènes et protéines peuvent être identifiées par leurs séquences primaires, mais également par homologues de séquences ou alignements qui
10 définissent des groupes de protéines.

Les PFAM (Protein families database of alignments and Hidden Markov Models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection d'alignements de sequences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer
15 la répartition entre les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures connues de protéines.

Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30
20 lignées phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi d'identifier des domaines conservés anciens.

Selon l'invention, les termes « culture » et « fermentation » sont employés indifféremment pour désigner la croissance de la bactérie sur un milieu de culture
25 approprié comprenant une source de carbone simple.

Par source de carbone simple, selon la présente invention, on entend des sources de carbone utilisables par l'homme du métier pour la croissance normale d'un microorganisme, d'une bactérie en particulier qui peuvent être l'arabinose, le fructose, le galactose, le lactose, le maltose, le sucrose et le xylose. Une source
30 de carbone simple tout particulièrement préférée est le glucose.

La définition des conditions de culture des microorganismes selon l'invention (fermentation) est à la portée de l'homme du métier. On fermente

notamment les bactéries à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et 40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *C. glutamicum* et *S. cerevisiae* et d'environ 34°C pour *E. coli*.

5 La fermentation est généralement conduite en fermenteurs avec un milieu minéral de culture de composition connu défini et adapté en fonction des bactéries utilisées, contenant au moins une source de carbone simple et le cas échéant un cofacteur nécessaire à la production du métabolite.

10 En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96), plus particulièrement le milieu de culture minimum décrit ci-dessous :

K ₂ HPO ₄	1g/l
N.T.A	0,2g/l
solution d'oligoélément*	10ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g/l
NaCl	0,2g/l
NaHCO ₃	0,2g/l
MgSO ₄	0,2g/l
glucose	20 à 100g/l
nitrate de sodium	0,424g/l
thiamine	10mg/l
FeSO ₄	50mg/l
Extrait de levure	4g/l
peptone	100mg/l

* solution d'oligoéléments : 100mg/l de chaque élément.

*solution d'oligoélément : Acide citrique à 4g/L, Mn SO₄ à 3g/L, Na Cl à 1g/L, Co Cl₂ à 0,1g/L, Zn SO₄ à 0,10g/L, Cu SO₄ à 10mg/L, H₃ BO₃ à 10mg/L, Na Mo O₄ à 10mg/L .

De manière analogue, le milieu minéral de culture pour *C. glutamicum* pourra ainsi être de composition identique ou similaire au milieu BMCG (Liebl et al., 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210) à un milieu tel que défini par Riedel et al. (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583).

La fermentation est préférentiellement réalisée en anaérobiose et en chemostat, c'est à dire, alimentée en continu, à un taux de dilution fixe, avec ledit milieu de culture minimum contenant une concentration en source de carbone fixe et étant dégazé à l'azote.

La concentration en source de carbone du milieu d'alimentation de la fermentation n'est augmentée que lorsque un régime permanent limité par la concentration en source de carbone résiduelle est atteint et stable pendant plusieurs jours.

Le mode de culture en chemostat est le mode de culture préférentiel car c'est celui qui favorise l'amélioration des performances de croissance et de production en 1,2-propanediol de la souche modifiée et conduit à isoler les microorganismes évolués.

20

Par activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée, on entend selon l'invention l'ensemble des activités enzymatiques améliorées impliquées dans la voie de conversion du DHAP en 1,2-propanediol. L'activité enzymatique améliorée dans le microorganisme évolué consiste en une augmentation de la quantité de 1,2-propanediol par le microorganisme évolué par rapport aux quantités produites par le microorganisme initial correspondant, dans des conditions de culture identiques.

25

Par activité « acétone synthase » améliorée, on entend selon l'invention, l'ensemble des activités enzymatiques améliorées impliquée dans la voie de conversion de l'acétate et de l'acétyl-coA en acétone. L'activité enzymatique évoluée dans le microorganisme évolué de deuxième génération consiste en une augmentation de la quantité d'acétone produite par le

30

microorganisme évolué de deuxième génération par rapport au microorganisme évolué transformé correspondant, dans des conditions de culture identiques.

5 L'invention concerne aussi l'isolement et la caractérisation des gènes évolués dans les souches évoluées obtenues par le procédé selon l'invention, et des protéines évoluées codées par lesdits gènes évolués. Ces gènes évolués peuvent être ensuite introduits dans un organisme hôte sous le contrôle d'éléments de régulation appropriés pour son expression dans ledit organisme afin de permettre la production de la protéine évoluée correspondante.

10 L'amélioration de performances des microorganismes modifiés, en particulier de la souche *E. coli* MG16555 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* au cours de la culture en chemostat suggère que ces conditions de culture permettent de sélectionner un complexe pyruvate déshydrogénase endogène fonctionnel en conditions d'anaérobioses, conditions
15 de fortes productions de NADH. Il est en effet connu que le complexe pyruvate déshydrogénase catalysant la transformation du pyruvate en acétyl-CoA en libérant du NADH n'est fonctionnel qu'en aérobie, alors que lorsqu'on est en condition d'anaérobiose c'est la pyruvate formate lyase qui est fonctionnelle et catalyse la transformation du pyruvate en acétyl-CoA et formate (Snoep J. L., De
20 Graef M. R., Westphal A. H., De Kok A. Teixeira de Mattos M. J. and Neijssel O. M. (1993). Or une des modifications effectuées, sur la souche modifiée d'*E. coli* construite pour la production de 1,2-propanediol, pour produire du NADH par décarboxylation du pyruvate, est la délétion des gènes *pflA* et *pflB* codant pour l'activité pyruvate formate lyase. La seule possibilité pour la cellule modifiée est de
25 métaboliser le pyruvate en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase en produisant un NADH. Le complexe pyruvate déshydrogénase de la souche modifiée évoluée a été caractérisé et est moins sensible au NADH que le complexe pyruvate déshydrogénase de la souche sauvage.

La présente invention conduit à la sélection d'un complexe pyruvate
30 déshydrogénase fonctionnel en anaérobiose qui permet de produire deux NADH par oxydation du dihydroxyacétate-3-phosphate en acétate. Le NADH qui ne pourrait être produit par la pyruvate formate lyase est produit par le complexe pyruvate déshydrogénase.

1.2propanediol. La sélection d'un complexe enzymatique peu sensible au NADH favorise la vitesse de production du 1.2propanediol.

La présente invention conduit à la sélection de mutations du gène *lpd* codant pour la lipoamide déshydrogénase du complexe pyruvate déshydrogénase.

5 Cette enzyme est connue pour être responsable de l'inhibition du complexe pyruvate déshydrogénase par le NADH.

La présente invention permet l'amélioration des performances des microorganismes modifiés, en particulier de la souche *E. coli* MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* également, par évolution, au
10 cours de la culture anaérobie en chemostat, des enzymes endogènes impliquées dans la voie de conversion du DHAP en 1.2propanediol. L'évolution de ces enzymes a pour conséquence une augmentation du taux de croissance et de la concentration finale en 1,2-propanediol.

Les activités méthylglyoxal synthase, méthylglyoxal réductase,
15 hydroxyacétone réductase et lactaldéhyde réductase sont déterminées *in vitro*, comparées avec les activités enzymatiques de la souche modifiée non évoluée, et purifiées pour une caractérisation biochimique et moléculaire. Cette stratégie permet de déterminer les enzymes évoluées ainsi que les gènes codants et de définir ainsi la voie de synthèse préférentielle du 1,2-propanediol.

20

Description des figures

Figure 1 : schéma du métabolisme de la souche modifiée *E. coli* pour la production de 1.2propanediol et d'acétone selon l'invention

Légende :

25 GLDH : glycérol déshydrogénase

LDH : lactate déshydrogénase

ADH : aldéhyde-alcool déshydrogénase

PFL : pyruvate formate lyase

PDHc : complexe pyruvate déshydrogénase

30 Figure 2 : comparaison de l'activité enzymatique du complexe pyruvate déshydrogénase de la souche sauvage et de la souche évoluée selon l'invention en fonction de concentrations croissantes en NADH.

Les exemples de réalisation ci-dessous permettent d'illustrer l'invention, sans chercher à en limiter la portée.

- 5 Exemples 1 : construction d'une souche modifiée d'*E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ capable de produire uniquement du 1,2-propanediol et de l'acétate par fermentation du glucose :

a) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA :: cm$:

- 10 L'inactivation du gène *tpiA* est réalisée en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645.

- 15 Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser le remplacement du gène *tpiA*:

DtpiAr de 100 bases (SEQ ID NO 1):

atgcgacatcctttagtgatgggtaactggaaactgaacggcagccgccacatgggttcacgagctggtttctaacct
gcgtaCATATGAATATCCTCCTTAG

avec :

- 20 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4109007-4109087) du gène *tpiA* (séquence 4108320 à 4109087), séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>

- 25 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645)

DtpiAf de 100 bases (SEQ ID NO 2):

cttaagccctgttagccgccttcgcagccttaacgattactgogaaggcgctcagcttcaagagaagcaccaccaacc
acCTGTAGGCTGGAGCTGCTTGG

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (4108320-4108400) du gène *tpiA*

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

- 5 Les oligonucléotides DtpiAr et DtpiAf sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle le système λ Red (γ , β , exo) exprimé favorise grandement la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors
- 10 sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides *cdh* et YIIQ.

cdh (SEQ ID NO 3) :

ggtgatgatagttatcgccg (homologue à la séquence de 4107536 à 4107555)

YIIQ (SEQ ID NO 4) :

- 15 cgtgccatcgacagcagtc (homologue à la séquence de 4109599 à 4109580)

- La cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation (Cheperanov P. P. and Wackernagel
- 20 W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant, gene, 158, 9-14). Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

- 25 b) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta pIfAB :: cm$:

L'inactivation des gènes *pIfA* et *pIfB* est réalisée en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie des gènes concernés. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. et Wanner, B.L. (2000).

pflAB 2 (SEQ ID NO 8) :

gtgaaagctgacaacccttttgatctttta (homologue à la séquence de 953660 à 983689)

c) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$:

La délétion des gènes *pflA* et *pflB* par remplacement des gènes par une cassette de résistance au chloramphenicol dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$ a été réalisée par la technique de transduction avec le phage P1. Le protocole est constitué de deux étapes, d'une part la préparation du lysat de phage sur la souche MG1655 $\Delta pflAB ::cm$ et d'autre part, la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$ par ce lysat de phage.

10 Préparation du lysat de phage :

- Ensemencement par 100µl d'une culture de nuit de la souche MG1655 ($\Delta pflAB ::cm$) de 10 ml de LB + Cm 30µg/ml + glucose 0,2% + CaCl₂ 5 mM
- Incubation 30 min à 37°C sous agitation
- addition de 100 µl de lysat de phage P1 préparé sur la souche sauvage MG1655 (environ 1.10⁹ phage/ml)
- Agitation à 37°C pendant 3 heures jusqu'à la lyse totale des cellules
- Ajout de 200 µl de chloroforme et vortex
- Centrifugation 10 min à 4500g pour éliminer les débris cellulaires
- Transfert du surnageant dans un tube stérile et ajout de 200 µl de chloroforme
- Conservation du lysat à 4°C

Transduction

- Centrifugation 10 min à 1500g de 5 ml d'une culture de nuit de la souche MG1655 ($\Delta tpiA$) en milieu LB
- Suspension du culot cellulaire dans 2,5 ml de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM
- Tubes témoins : 100 µl cellules
100 µl phages P1 de la souche MG1655 ($\Delta pflAB ::cm$)
- Tube test : 100 µl de cellules + 100 µl de phages P1 de la souche MG1655 ($\Delta pflAB ::cm$)
- Incubation 30 min à 30°C sans agitation
- Ajout de 100 µl de citrate de sodium 1 M dans chaque tube puis vortex

- Ajout de 1 ml de LB
 - Incubation 1 heure à 37°C sous agitation
 - Etalement sur des boîtes LB + Cm 30 µg/ml après centrifugation 3 min à 7000 rpm des tubes.
- 5 - Incubation à 37°C jusqu'au lendemain
- Vérification de la souche

Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la région contenant (*pflAB::cm*) est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides *pflAB1* et *pflAB2* d'une part, et *cdh* et *YIIQ* d'autre part, afin de vérifier également la délétion du gène *tpiA* dans la souche $\Delta pflAB :: cm$. La souche retenue est dénommée MG1655 $\Delta(pflAB :: cm, \Delta tpiA)$.

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche obtenue est appelée MG16555 $\Delta tpiA, \Delta pflAB$.

d) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta adhE :: cm$:

Comme précédemment l'inactivation du gène *adhE* est réalisée en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie du gène concerné par la technique décrite par Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

25 DadhE r de 100 bases (SEQ ID N° 9) :

atggctgttactaaigtgcgtgaacttaacgcactcgttagagcgtgtataaaaaagcccagcgtgaatatgccagttt
cactCATATGAATATCCTCCTTAG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence *adhE* (GenBank accession number U00180) de la souche *E. coli* MG1655. La séquence de référence est la séquence *adhE* de la souche *E. coli* MG1655.

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000)

DadhEf de 100 bases (SEQ ID NO 10):

5 caataacgaatgatagcaattttaagtagttaggaggtgaaaaatgctgtcaaaaggcgtattgtcagcgctctttt
caTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1294694-1294774) du gène *adhE*

10 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides DadhEr et DadhEf sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides ychGf et adhECr.

ychGf (SEQ ID N° 11) :

20 ggctcattgcaccaccatccag (homologue à la séquence de 1293794 à 1294545)

adhECr (SEQ ID N° 12) :

gaaaagacgcgctgacaatacgcc (homologue à la séquence de 1297821 à 1298468)

e) construction d'une souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$:

La délétion du gène *adhE* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$ est effectuée comme précédemment à l'aide de la technique de transduction à l'aide de phage P1 (voir protocole au c). Le lysat de phage P1 est effectué sur la souche MG1655 $\Delta adhE::cm$, et la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA\Delta pflAB$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les transductants résistants au chloramphenicol sont contrôlés à l'aide des oligonucléotides ychCf et adhECr pour vérifier la mutation du gène *adhE* et aussi à l'aide des oligonucléotides pflAB1 et pflAB2 d'une part, et

cdh et YIIQ d'autre part, afin de vérifier également la délétion des gènes *pflA* et *B*, et *tpiA* dans la souche $\Delta adhE :: cm$.

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaise FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche obtenue est appelée MG16555 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$.

f) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$:

L'inactivation du gène *ldhA* (coordonnées 1439878 à 1440867) dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$ a été réalisée comme précédemment à l'aide de la technique du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage est réalisé avec la souche *E. coli* K12 NZN11 $\Delta plf :: cam$, $ldhA :: kana$ fourni par Clark D.P. (Bunch P. K., Mat-Jan F. and Clark D. P. (1997) The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*: microbiology, 143, 187-195.). La transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$ est réalisée à l'aide du lysat de phage de la souche *E. coli* K12 NZN11 $\Delta plf :: cam$, $ldhA :: kana$. Les transductants sont sélectionnés sur kanamycine et l'insertion de la cassette kanamycine dans le gène *ldhA* est vérifiée à l'aide des oligonucléotides hslJC et *ldhAC2*.

hslJC (SEQ ID N° 13) :

gccatcagcaggccttagccg (homologue à la séquence 1439345 à 1439767)

ldhAC2 : (SEQ ID N° 14) :

gggtatgtgtggcatgtttaaccg (homologue à la séquence 1441007 à 1441029)

La souche obtenue est appelée MG16555 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA ::$

kana

g) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$:

L'inactivation du gène *gloA* est réalisée comme précédemment en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie des gènes concernés par la technique décrite par Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000).

5 Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

GLOAD f de 100 bases (SEQ ID N°15)

atgcgctcttctcataccatgctgcgcggtggcgatttgcaacgctccatcgattttataccaaagtgctgggcatgaa
GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

10 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1725861-1725941) du gène *gloA* (séquence 1725861 à 1726268), séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000))

GLOA D R (SEQ ID N°16)

ttagtgcccagaccgcgaccggcgctcttctcttcgattaactcaatttgtaaccggtccggatctccacaaacgcg
aCATATGAATATCCTCCTTAG

20 une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1726188 – 1726268) du gène *gloA* (1725861 – 1726268)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides GLOADr et GLOADf sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit
25 PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides Nem A C d et Rnt C r .

30 NemAQd (SEQ ID NO 17) :

gaagtggatcgatgccgggattgaagaatggg (homologue de 1725331 à 1725361)

Rnt Cr (SEQ ID NO18) :

gggttacgtttcagtgaggcgcgttctgcgg (homologue à la séquence de 1726765 à 1726795)

h) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$:

L'inactivation du gène *gloA* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$ a été réalisée comme précédemment à l'aide de la technique du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage P1 est effectué sur la souche MG1655 $\Delta gloA :: cm$, et la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les transductants résistants au chloramphénicol sont contrôlés à l'aide des oligonucléotides NemAQd et Rnt Cr pour vérifier la mutation du gène *gloA* et aussi à l'aide des oligonucléotides, *pflAB1* et *pflAB2*, *cdh* et *YIIQ*, *ychCf* et *adhECr*, *hslJC* et *ldhAC2*, afin de vérifier également respectivement la délétion des gènes *pflA* et *B*, *tpiA*, *adhE*, et *ldhA* dans la souche $\Delta gloA :: cm$.

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche obtenue est appelée MG16555 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$.

i) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta aldA :: cm$

L'inactivation du gène *aldA* est réalisée comme précédemment en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie des gènes concernés par la technique décrite par Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

1) Oligonucléotides de 18 bases (SEQ ID NO19)

atgtcagtacccgttcaacatcctatgtatatcgatggacagtttggttacctggcgtggagacgcatggattg
atgtggtaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1486256 -
5 1486336) du gène *aldA* (séquence 1486256 à 1487695), séquence de référence
sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de
résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner,
B.L. (2000)

10 aldAD r de 100 bases (SEQ ID N°20):

ttaagactgtaaataaaccacctgggtctgcagatattcatgcaagccatgtttaccatctgcgccgccaataccgg
atttCATATGAATATCCTCCTTAG

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (1487615 -
1487695) du gène *aldA* (1486256 à 1487695)

15 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de
résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides AldA D r et aldAD f sont utilisés pour amplifier la
cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit
PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655
20 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la
recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors
sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse
PCR avec les oligonucléotides Ydc F C f et gapCCr .

Ydc F C f (SEQ ID NO 21) :

25 tgcagcggcgcacgatggcgacgttccgccg (homologue de 1485722 à 1485752)

gapCCr (SEQ ID NO22) :

cacgatgacgaccattcatgcctatactggc (homologue à la séquence de 1488195 à
1488225)

h) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$,
30 $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$

L'inactivation du gène *aldA* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$ a été réalisée comme précédemment à l'aide de la technique du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage P1 est effectué sur la souche MG1655 $\Delta aldA :: cm$, et la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les transductants résistants au chloramphénicol sont contrôlés à l'aide des oligonucléotides Ydc F C f et gapCCr pour vérifier la mutation du gène *aldA* et aussi à l'aide des oligonucléotides, NemAQd et Rnt Cr, *pflAB1* et *pflAB2*, *cdh* et YIIQ, *ychCf* et *adhECr*, *hslJC* et *ldhAC2*, afin de vérifier également respectivement la délétion des gènes *gloA*, *pflA* et *B*, *tpiA*, *adhE* dans la souche $\Delta aldA :: cm$.

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche obtenue est appelée MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$.

g) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG 1655 $\Delta aldB :: cm$:

L'inactivation du gène *aldB* est réalisée comme précédemment en insérant une cassette de résistance à l'antibiotique chloramphénicol tout en déléant la majeure partie des gènes concernés par la technique décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000).

Deux oligonucléotides sont utilisés pour réaliser la délétion :

AldB D f de 100 bases (SEQ ID N°23)

tcagaacagccccaacgggttatccgagtagctcaccagcaggcacttggttgctggtaatgctccagcatcatctt
gtGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3752603-3753331) du gène *aldB* (séquence 3752603 à 3753331), séquence de référence
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/3752603.1.fna>

une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000)

aldBD r de 100 bases (SEQ ID N°24):

5 atgaccaataatcccccttcagcacagattaagcccggcgcgagtatggtttccccctcaagttaaaagcccgctatg
acaaCATATGAATATCCTCCTTAG

une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (3754061-3754141) du gène *aldB* (3752603 à 3754141)

10 une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol portée par le plasmide pKD3

Les oligonucléotides AldB D r et aldB D f sont utilisés pour amplifier la cassette de résistance au chloramphénicol à partir du plasmide pKD3. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinaise exprimée permet la
15 recombinaison homologue. Les transformants résistants à l'antibiotique sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides aldB C f et YiaYCr .

aldB C f (SEQ ID NO 25) :

20 catatttccctcaaagaatataaaaaagaacaattaacgc (homologue à la séquence de 3752057 à 3752095)

YiaYCr (SEQ ID NO26) :

tatgttcattgcgatggcgcaccagctgggacg (homologue à la séquence de 3754644 à 3754674)

25 h) construction d'une souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$

L'inactivation du gène *aldB* dans la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$ a été réalisée comme précédemment à l'aide de la technique du phage P1 (voir protocole en c)). Le lysat de phage P1 est effectué sur la souche MG1655 $\Delta aldB :: cm$, et la transduction de la souche MG1655 $\Delta tpiA$,
30 $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$ est réalisée à l'aide de ce lysat. Les transductants résistants au chloramphenicol sont contrôlés à l'aide des

oligonucléotides aldB C f et YiaYCr pour vérifier la mutation du gène *aldB* et aussi à l'aide des oligonucléotides, NemAQd et Rnt Cr, pflAB1 et pflAB2, cdh et YIIQ, ychCf et adhECr, hslJC et ldhAC2, Ydc F C f et gapCCr, afin de vérifier également respectivement la délétion des gènes *gloA*, *pflA* et *B*, *tpiA*, *adhE*, *aldA* dans la souche $\Delta aldB :: cm$.

Comme précédemment, la cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est alors introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de culture à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment. La souche obtenue est appelée MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$.

Exemple 2 : Culture et évolution de la souche modifiée *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ en chemostat :

Pour optimiser la production de 1,2-propanediol à partir de glucose par la souche *E. coli* MG16555 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, une culture de la souche en chemostat, dans un milieu de culture minimum, supplémenté en nitrate de sodium et en extrait de levure, pendant plusieurs semaines, est réalisée en condition d'anaérobiose.

Au début de la culture, la concentration initiale en glucose dans le bidon d'alimentation de la culture est de 20 g/l, le taux de dilution est de 0,04h⁻¹ et un flux d'azote continu est maintenu pour réaliser les conditions d'anérobiose. La concentration cellulaire et les productions en 1,2-propanediol et acétate sont faibles. Après plusieurs semaines de culture, la croissance et les concentrations en produits augmentent, un régime permanent est atteint caractérisé par une concentration en glucose résiduel nulle et des concentrations en produits constantes (résultats non présentés).

Après le régime permanent est maintenu pendant plusieurs jours, la concentration en glucose est maintenue à 20 g/l dans le bidon d'alimentation et la culture est maintenue en condition d'anaérobiose.

augmentée à 40 g/l. Cette augmentation de la concentration initiale en glucose entraîne une augmentation des concentrations en biomasse et en produits après quelques semaines de culture dans ces conditions. Un deuxième régime permanent est alors atteint caractérisé par une concentration en glucose limitante et des concentrations en produits stables (acétate et 1.2propanediol) supérieures aux concentrations caractérisant le régime précédent.

Lorsque ce régime permanent se maintient pendant plusieurs jours, la concentration initiale dans le bidon d'alimentation de la culture est augmentée à 60 g/l. L'augmentation de la concentration initiale en glucose entraîne cette fois juste une légère augmentation de la concentration en biomasse et en produits après quelques semaines de culture dans ces conditions. La limitation en glucose n'est jamais atteinte. La concentration en acétate est de 15 g/l, concentration à laquelle il inhibe la croissance de la souche. La culture est donc bloquée par l'inhibition par l'acétate empêchant une amélioration des performances de la souche.

Exemple 3 : Caractérisation d'un complexe pyruvate déshydrogénase évolué peu sensible au NADH :

L'évolution du complexe pyruvate déshydrogénase (PDHc) vers un PDHc peu sensible au NADH est mis en évidence à la fois par un dosage de l'activité de l'enzyme évoluée *in vitro*, et, par comparaison de la séquence d'un des gènes (*lpd*) codant pour la lipoamide déshydrogénase du PDHc évolué avec celle du gène du PDHc natif.

a) dosage de l'activité enzymatique du complexe pyruvate déshydrogénase :

Le dosage de l'activité enzymatique du PDHc *in vitro* de la souche *E. coli** MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana* , Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* est effectué selon le protocole décrit par Schwartz et Reed (Schwartz E. R. and Reed L. J. (1970) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*, Biochemistry, 6,1434-1439).

Un volume de 100 ml de culture cellulaire est prélevé du chemostat dans des fioles préalablement dégazées et rentrées sous une hotte anaérobie. Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 6000 rpm. Le culot est mis en suspension dans environ 100 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM, pH7.9, 0.5 mM
5 thiamine pyrophosphate, puis centrifugées de nouveau 10 minutes à 6000 rpm. Le lavage est effectué une deuxième fois dans les mêmes conditions. Le culot cellulaire est mis en suspension dans 800µl de tampon. La suspension cellulaire est désintégrée au moyen d'un appareil à ultrasons en 4 cycles de traitement (30 secondes à 30%), entrecoupés de 2 minutes de repos dans de la glace. Les
10 débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 5 minutes à 13400 rpm, le surnageant est l'extrait acellulaire brut. Les sels présents dans l'extrait acellulaire, susceptibles d'interférer dans le dosage enzymatique, sont éliminés par passage de l'extrait à travers une colonne PD10 équilibrée avec du tampon phosphate de potassium pH 7,9, 0,5mM de thiamine pyrophosphate. L'extrait est élué avec
15 3,5ml du même tampon que précédemment. L'éluat récupéré est l'extrait acellulaire brut.

L'activité enzymatique de l'extrait acellulaire brut est mesurée dans un premier temps en absence de NADH, puis dans un deuxième temps en présence de concentrations croissantes de NADH de 0.14 mM à 2.7 mM . Les résultats
20 obtenus sont comparés avec ceux présentés dans la littérature pour la souche d'*E. coli* sauvage figure n° 3 (Snoep J. L., De Graef M. R., Westphal A. H., De Kok A. Teixeira de Mattos M. J. and Neijssel O. M. (1993) Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*: implications for
25 their activity *in vivo*, FEMS microbiology letters, 114,279-284)).

Les résultats obtenus indiquent que le PDHc de la souche modifiée *E. coli* MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* évoluée est moins sensible au NADH que la souche sauvage d'*E. coli*. Pour un rapport
30 $[NAD^+]/[NADH] \approx 33$, une inhibition totale de l'activité du PDHc de la souche sauvage est observée, alors que 80% de l'activité du PDHc évoluée est mesurée.

b) Détermination de la séquence du gène *lpd* codant pour la lipoamide déshydrogénase du complexe pyruvate déshydrogénase de la souche MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée :

L'ADN chromosomique de la souche *E. coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ est extrait à partir de 1 ml d'une culture de nuit en LB. Après centrifugation, les cellules sont lavées avec de l'eau stérile puis éclatées par choc thermique 5 minutes à 94°C. L'ADN chromosomique est récupéré dans le surnageant après centrifugation. Le gène *lpd* (séquence 127912 à 129336) codant pour la lipoamide déshydrogénase (E3) du complexe pyruvate déshydrogénase est amplifié par PCR à l'aide des deux oligonucléotides suivants :

AceEf (SEQ ID N°27)

cgcgatgatcgacggtgctgatgggtgccc (homologue à la séquence 127504 à 127532)

YacH r (SEQ ID N°28)

aagttcaggagagccgccc (homologue à la séquence 127513 à 129531)

Un produit PCR de 2000 paires de bases correspondant au gène *lpd* est obtenu et séquencé. Les résultats obtenus montrent la présence d'une mutation ponctuelle entraînant le remplacement de l'alanine 55 par une valine.

Exemple 4 : Caractérisation des enzymes de la voie de synthèse du 1,2-propanediol de la souche modifiée *E. Coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée :

Les enzymes impliquées dans la synthèse du 1,2-propanediol à partir de dihydroxyacétone phosphate de la souche *E. Coli* MG1655 $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $ldhA :: kana$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$ évoluée sont caractérisées *in vitro*.

Un volume de 100 ml de culture cellulaire est prélevé du chemostat dans des fioles préalablement dégazées et rentrées sous une hotte anaérobie. Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 6000 rpm. Le culot est mis en suspension dans environ 100 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM, puis centrifugées de nouveau 10 minutes à 6000 rpm. Le lavage est effectué une deuxième fois dans les mêmes conditions. Le culot cellulaire est mis en

suspension dans 800µl de tampon. La suspension cellulaire est désintégrée au moyen d'un appareil à ultrasons en 4 cycles de traitement (30 secondes à 30%), entrecoupés de 2 minutes de repos dans de la glace. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 5 minutes à 13400 rpm, le surnageant est l'extrait
 5 acellulaire brut.

Des dosages des activités enzymatiques de l'extrait acellulaire brut sont effectués pour chaque enzyme en présence des différents substrats respectifs DHAP, méthylglyoxal, hydroxyacétone, (S et R)lactaldehyde et de NADH, NAD⁺, NADPH ou NADP⁺. Le niveau d'expression des enzymes de la souche évoluée
 10 est ainsi comparé au niveau d'expression des enzymes de la souche non évoluée. Les protéines contenues, soit dans l'extrait acellulaire obtenu à partir de la culture de la souche *E. Coli* *MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA:: kana*, Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* évoluée, soit dans l'extrait acellulaire obtenu à partir de la culture de la souche *E. Coli* MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA:: kana* , Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB*
 15 non évoluée, sont déposées et séparées sur des gels de polyacrylamide en conditions natives. Les gels sont ensuite exposés avec, soit du DHAP et du NAD⁺ ou du NADP⁺, soit du méthylglyoxal et du NAD⁺ ou du NADP⁺, soit de l'hydroxyacétone et NAD⁺ ou du NADP⁺, soit du (S) ou du (R) lactaldéhyde et du NAD⁺ ou du NADP⁺. La réaction est réalisée en présence phénazine
 20 méthosulfate qui couple le transfert d'électron entre le NADH ou le NADPH produit par la réaction et un colorant le bromure de tétrazolium qui forme un précipité dans le gel. Les différentes enzymes évoluées impliquées dans la voie de réduction du DHAP en 1,2-propanediol sont ainsi identifiées dans la souche évoluée après découpe de la bande sur gel natif, élution de la proteine et
 25 séquençage N-terminal.

Exemple 5 : Construction d'une souche modifiée *E. Coli* MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA :: kana* , Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* (*pSOS95T*) capable de produire du 1,2-propanediol et de l'acétone :

11 Le plasmide appelé *pSOS95T* est un vecteur novote d'expression pour *E. coli*. L'anneau d'ADN portant l'origine de réplique de *Shigella* *disenteriae* est inséré dans le vecteur *pSOS95T* par recombinaison. Les séquences de

l'acétoacétate carboxylase, la coenzyme A transférase et la thiolase sous la dépendance du promoteur thiolase. Ces trois enzymes catalysent la transformation de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone et dioxyde de carbone. Ce plasmide est introduit dans la souche *E. coli** MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*,
 5 *ldhA* :: *kana* , Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* évoluée par électroporation.

Des cellules électrocompétentes de la souche *E. coli** MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana* , Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* sont préparées à partir d'une culture de nuit de la souche en LB. Une culture de 10 ml LB en erlenmeyer est ensemencée au 100^{ième} par la culture de nuit et incubée à 37°C. Lorsque la
 10 densité optique à 550 nm de la culture atteint une valeur comprise entre 0.4 et 0.6, 1 ml de culture est centrifugée. Les cellules sont lavées avec de l'eau, puis avec une solution de glycérol à 10%, avec d'être resuspendues dans 0.05 ml de d'une solution de glycérol à 10 %. Les cellules sont électroporées immédiatement (25 μ F, 200 Ω , 2.5KV) (Gene pulser, Biorad) avec 5 μ l de la préparation plasmidique
 15 pSOS95T (Qiagen, Hilden germany). Après 1 heure d'expression phénotypique en milieu SOC (Sambrook J., Fristch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, 2 nd ed Cold Spring Harbor Laboratory, cold Spring Harbor, N.Y.) à 37°C, les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé avec de la carbenicilline 100 μ g/ml à 37°C.

20 Les transformants sont remis en culture liquide en présence de carbénicilline pendant une nuit pour réaliser une extraction d'ADN plasmidique (Qiagen, Hilden Germany) afin de contrôler la présence du plasmide pSOS95T et de vérifier par digestion enzymatique qu'il est correct.

25 Exemple 6 : Culture de la souche modifiée *E. Coli* *MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana* , Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* (*pSOS95T*) évoluée capable de produire du 1,2-propanediol et de l'acétone :

La souche modifiée *E. Coli* * MG1655 Δ *tpiA*, Δ *pflAB*, Δ *adhE*, *ldhA* :: *kana* , Δ *gloA*, Δ *aldA*, Δ *aldB* (*pSOS95T*) évoluée est cultivée en chemostat dans un milieu
 30 de culture minimum supplémenté en nitrate de sodium et en extrait de levure avec une concentration initiale en glucose de 60g/l en condition d'anaérobiose (figure 2).

La croissance de la souche et la production de 1,2-propanediol et d'acétone augmentent jusqu'à ce que la concentration en acétate atteigne 15 g/l. Au cours du temps, la concentration en acétate diminue au profit de l'acétone et entraîne une augmentation de la croissance et de la concentration en 1,2-propanediol produite.

REFERENCES

- ✓ Altaras N. E. and Cameron D. (1999) Metabolic engineering of a 1,2-propanediol pathway in *Escherichia coli* : *Appl. Env. Microb.*, 65, 1180-1185.
- ✓ Altaras N. E. and Cameron D. C. (2000) Enhanced production of (R) 1,2-propanediol by metabolically engineered *Escherichia coli* : *Biotechnol. Prog.* 16, 940-946
- ✓ Altaras NE, Etzel MR and Cameron DC. (2001) Conversion of sugars to 1,2-propanediol by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8 : *Biotechnol. Prog.* 17, 52-56
- ✓ Bunch P. K., Mat-Jan F. and Clark D. P. (1997) The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli* : *microbiology*, 143, 187-195.
- ✓ Cameron D. C., Altaras N. E., Hoffman M. L. and Shaw A. J. (1998) Metabolic engineering of propanediol pathways : *Biotechnol. Prog.*, 14, 116-125.
- ✓ Cameron D. C., Shaw A. J. and Altaras N. E. (1998) Microbial production of 1,2-propanediol from sugar WO 98/37204
- ✓ Cameron D. C., Shaw A. J. and Altaras N. E. (2000) Microbial production of 1,2-propanediol from sugar US 6 087 140
- ✓ Cameron D. C., Shaw A. J. and Altaras N. E. (2001) Microbial production of 1,2-propanediol from sugar US 6.303 352
- ✓ Cheperanov P. P. and Wackernagel W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Cm^R cassettes with action of Flp-catalyzed recombination antibiotic resistance determinants. *Gene* 173 3-4

- ✓ Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645
- 5 ✓ Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, 2 nd ed Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- ✓ Schwartz E. R. and Reed L. J. (1970) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 6, 1434-1439
- 10 ✓ Snoep J. L., De Graef M. R., Westphal A. H., De Kok A. Teixeira de Mattos M. J. and Neijssel O. M. (1993) Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*: implications for their activity *in vivo*, *FEMS microbiology letters*, 114, 279-284)).
- 15 ✓ Tran Din K. and Gottschalk G. (1985) Formation of D(-)-1,2-propanediol and D(-)-lactate from glucose by *Clostridium sphenoides* under phosphate limitation : *Arch. Microbiol.* 142, 87-92.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'une souche de microorganismes évolués pour la production de 1,2-propanediol par métabolisme d'une source de carbone simple, ledit procédé comprenant la culture sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple, d'une souche bactérienne initiale comprenant une délétion du gène *tpiA* et une délétion d'au moins un gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal (propanal) en lactate, afin de faire évoluer dans ladite souche initiale un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du DHAP en méthylglyoxal puis en 1,2-propanediol vers des gènes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée, puis on sélectionne et on isole la ou les souches de microorganismes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal en lactate est choisi parmi *gloA*, *aldA* et *aldB*.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la souche initiale comprend la délétion des gènes *gloA*, *aldA*, *aldB* et *tpiA*.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la souche initiale comprend également une délétion des gènes *ldhA*, *pflA*, *pflB* et *adhE*.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la souche initiale comprend également au moins un gène codant pour une enzyme favorisant le métabolisme du pyruvate en acétate.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'enzyme favorisant le métabolisme du pyruvate en acétate est peu sensible à l'inhibition par le NADH.
7. Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que ladite enzyme favorise le métabolisme du pyruvate vers la production d'acétyl-CoA et de NADH.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'enzyme est un complexe pyruvate déshydrogénase.
9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que l'enzyme favorisant le métabolisme du pyruvate en acétate est une enzyme anaérobie.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'une souche de microorganismes évolués pour la production de 1,2-propanediol par métabolisme d'une source de carbone simple, ledit procédé comprenant la culture sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple, d'une souche initiale de microorganismes comprenant une délétion du gène *tpiA* et une délétion d'au moins un gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal (propanal) en lactate, afin de faire évoluer dans ladite souche initiale un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du DHAP en méthylglyoxal puis en 1,2-propanediol vers des gènes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée, puis on sélectionne et on isole la ou les souches de microorganismes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal en lactate est choisi parmi *gloA*, *aldA* et *aldB*.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la souche initiale comprend la délétion des gènes *gloA*, *aldA*, *aldB* et *tpiA*.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la souche initiale comprend également une délétion des gènes *ldhA*, *pflA*, *pflB* et *adhE*.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la souche initiale comprend également au moins un gène codant pour une enzyme favorisant le métabolisme du pyruvate en acétate.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'enzyme favorisant le métabolisme du pyruvate en acétate est peu sensible à l'inhibition par le NADH.
7. Procédé selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que ladite enzyme favorise le métabolisme du pyruvate vers la production d'acétyl-CoA et de NADH.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'enzyme est un complexe pyruvate déshydrogénase.
9. Procédé selon l'une des revendications 6 à 8, caractérisé en ce que l'enzyme favorisant le métabolisme du pyruvate en acétate est une enzyme endogène.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'on introduit dans la souche évoluée un ou plusieurs gènes hétérologues codant pour une ou plusieurs enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le ou les gènes hétérologues codant pour une ou plusieurs enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate proviennent de *C. acetobutylicum*.
12. Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce l'on cultive sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple une souche évoluée modifiée obtenue selon l'une des revendications 10 ou 11 afin de faire évoluer dans ladite souche évoluée modifiée un ou plusieurs gènes impliqués dans la conversion de l'acétyl-CoA et de l'acétate en acétone vers une activité « acétone synthase » améliorée, puis on sélectionne et on isole les microorganismes évolués de deuxième génération ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée et une activité « acétone synthase » améliorée.
13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la souche est choisie parmi les bactéries, les levures et les champignons.
14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la souche est choisie parmi une souche d'*Escherichia*, en particulier *E. coli*, et de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.
15. Souche initiale telle que définie selon l'une des revendications 1 à 9.
16. Souche évoluée susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 1 à 14.
17. Procédé de préparation de 1,2-propanediol dans lequel on cultive une souche évoluée selon la revendication 16 dans un milieu de culture approprié comprenant une source simple de carbone, puis on récupère le 1,2-propanediol produit.
18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'on récupère du 1,2-propanediol et de l'acétone.
19. Procédé selon l'une des revendications 17 ou 18, caractérisé en ce que le 1,2-propanediol et l'acétone sont purifiés.

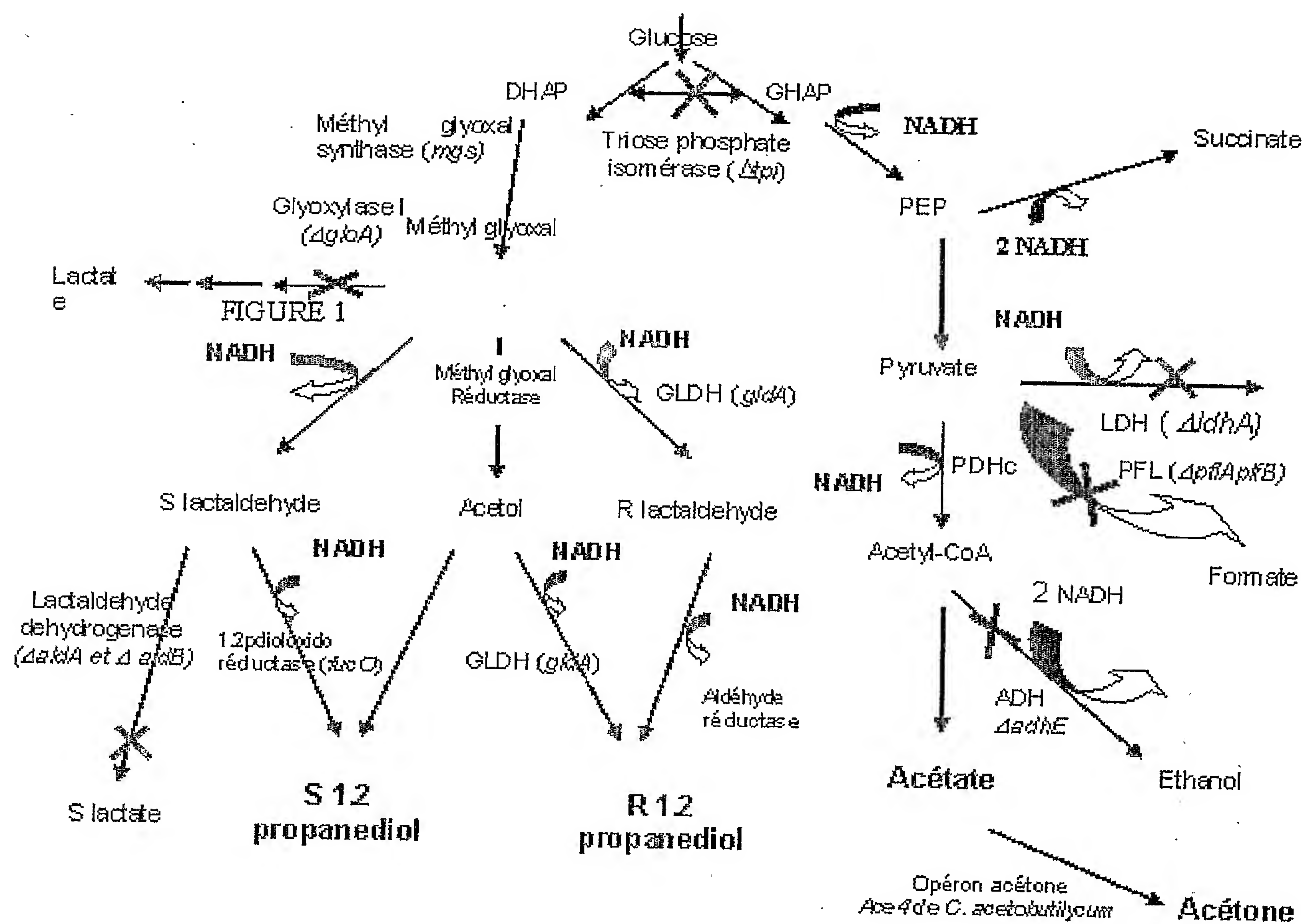


Fig. 1

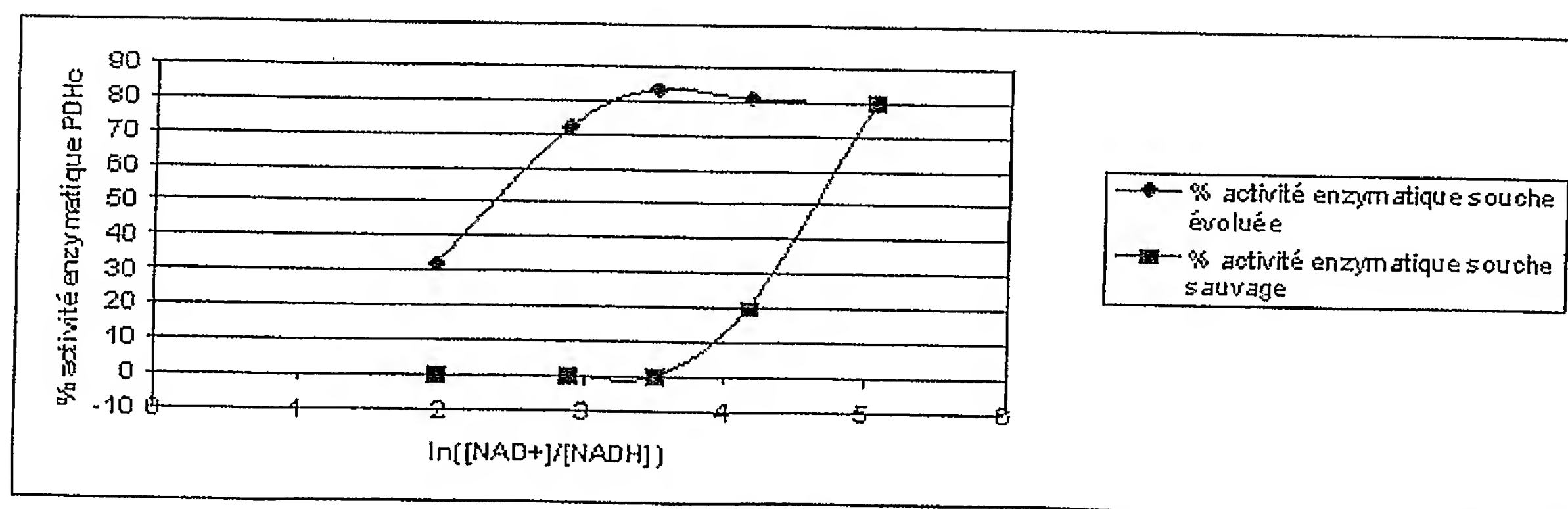


Fig. 2

241101.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> METABOLIC EXPLORER

<120> préparation d'un microorganisme évolué pour la production de
1,2-propanediol

<130> 241101

<160> 28

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 1

atgcgacatc ctttagtgat gggtaactgg aaactgaacg gcagccgcca catggttcac 60

gagctgggttt ctaacctgcg tacatatgaa taccctcctt ag 102

<210> 2

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2

cttaagcctg tttagccgct tctgcagctt taacgattac tgcgaaggcg tcagctttca 60

gagaagcacc accaaccagc tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

241101.ST25.txt

ggtgatgata gttatcgccg

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4

cgtgccatcg acagcagtcc

20

<210> 5

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 5

ccggacatcc tgcgttgccg taaatctggt gttctgaccg gtctgccaga tgcatatggc

60

cgtggccgta tcatcggtga catatgaata tcctccttag

100

<210> 6

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6

gatgcactat aagatgtggt aaaaacgctg tagcagaatg aagcgcgga taaaaaagcg

60

gcaactcaat aaagttgccg ctggagctgc ttcg

94

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 7

agacattaaa aatatacgtg cagctacccg

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

241101.ST25.txt

<213> Artificial

<400> 8
gtgaaagctg acaacccttt tgatctttta

30

<210> 9

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 9
atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gcactcgtag agcgtgtaaa aaaagcccag 60
cgtgaatatg ccagtttcac tcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 10

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 10
caataacgaa tgatagcaat tttaagtagt taggaggtga aaaatgctgt caaaaggcgt 60
attgtcagcg cgtcttttca tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 11
ggctcattgc accaccatcc ag 22

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<210> 11
<211> 22

241101.ST25.txt

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 13

gccatcagca ggcttagccg

20

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 14

gggtattgtg gcatgtttaa ccg

23

<210> 15

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 15

atgcgtcttc ttcataccat gctgcgcgtt ggcgatttgc aacgctccat cgatttttat

60

accaaagtgc tgggcatgaa gtgtaggctg gagctgcttc g

101

<210> 16

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 16

ttagttgccc agaccgcgac cggcgtcttt ctcttcgatt aactcaattt tgtaaccgtc

60

cggatcttcc acaaacgcga catatgaata tcctccttag

100

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

241101.ST25.txt

<400> 17
gaagtgggtcg atgccgggat tgaagaatgg g 31

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 18
gggttacgtt tcagtgaggc gcgttctgcg g 31

<210> 19

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 19
atgtcagtac ccgttcaaca tcctatgtat atcgatggac agtttggttac ctggcgtgga 60
gacgcatgga ttgatgtggt agtgtaggct ggagctgctt cg 102

<210> 20

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 20
ttaagactgt aaataaacca cctgggtctg cagatattca tgcaagccat gtttaccatc 60
tgcgccgcca ataccggatt tcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 21
tgcgccgcca ataccggatt tcatatgaat atcctcctta g 101

241101.ST25.txt

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 22

cacgatgacg accattcatg cctatactgg c

31

<210> 23

<211> 101

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 23

tcagaacagc cccaacgggtt tatccgagta gctcaccagc aggcacttgg ttgctggta 60

atgctccagc atcatcttgt gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 24

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 24

atgaccaata atcccccttc agcacagatt aagcccggcg agtatggttt cccctcaag 60

ttaaaagccc gctatgacaa catatgaata tcctccttag 100

<210> 25

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 25

catatttccc tcaaagaata taaaaaagaa caattaacgc

40

<210> 26

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

241101.ST25.txt

<400> 26
tatgttcacg cgatggcgca ccagctgggc g 31

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 27
cgcgatgatc acggtgctga tggcgcccg 29

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 28
aagttcagga gagccgccc 19



reçue le 12/02/04

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 1 . 1.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier
(facultatif)

241101 D21874 FT

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

04 00 214

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Microorganisme évolué pour la production de 1,2-propanediol

LE(S) DEMANDEUR(S) :

METABOLIC EXPLORER :

BIPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom MEYNIAL-SALLES Isabelle

Prénoms

Adresse

Rue

15, chemin Montroux

31450 FOURQUEVAUX

Code postal et ville

Société d'appartenance (facultatif)

Nom

GONZALEZ Benjamin

Prénoms

Adresse

Rue

4, rue Sidoine Apollinaire

63000 CLERMONT-FERRAND

Code postal et ville

Société d'appartenance (facultatif)

Nom

SOUCAILLE Philippe, Noel, Paul

Prénoms

Adresse

Rue

Chant du Coucou

31450 DEYME

Code postal et ville

Société d'appartenance (facultatif)

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

12 janvier 2004

Franck Tetaz

CPI 94-1103

